

## **ENDO-beta-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE AND PRODUCTION THEREOF**

Patent Number: JP1309685  
Publication date: 1989-12-14  
Inventor(s): TOCHIKURA TATSUROKURO; others: 03  
Applicant(s):: SEITETSU KAGAKU CO LTD  
Requested Patent: ☐ JP1309685  
Application Number: JP19880140055 19880606  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12N9/44  
EC Classification:  
Equivalents: JP2699177B2

### **Abstract**

**NEW MATERIAL:** An enzyme having an activity to specifically hydrolyzing the N,N'-diacetylchitobiose segment of a sugar chain of a glycoprotein bonded with asparagine residue and isolate an oligosaccharide.

**USE:** A reagent useful for the analysis of the structure and function of a sugar chain of a glycoprotein. Active to almost all types of asparagine-bonded sugar chains. Available in large quantity at a low cost.

**PREPARATION:** The objective enzyme is separated from a cultured product of a microbial strain belonging to genus *Mucor* and capable of producing the objective enzyme [e.g., *Mucor hiemalis* (FERM P-10020)].

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

Endo M.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

平1-309685

⑫ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)12月14日

C 12 N 9/44  
// (C 12 N 9/44  
C 12 R 1:785)

7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全7頁)

⑭ 発明の名称 エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼおよびその製造法

⑮ 特 願 昭63-140055

⑯ 出 願 昭63(1988)6月6日

特許法第30条第1項適用 昭和63年3月15日 社団法人日本農芸化学発行の「日本農芸化学会誌62巻03号」に発表

⑰ 発 明 者 橋 倉 辰 六 郎 京都府向日市上植野町野上山31-12

⑱ 発 明 者 山 本 孝 二 滋賀県大津市朝日が丘1-2-38

⑲ 発 明 者 門 脇 節 京都府京都市右京区御室芝橋町2

⑳ 発 明 者 藤 崎 正 時 大阪府羽曳野市南恵我之荘1丁目1-3

㉑ 出 願 人 製鉄化学工業株式会社 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

1. 発明の名称

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ  
およびその製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 糖タンパク質のアスバラギン残基の結合する  
部位に作用して、糖鎖のN、N'-ジアセチルキ  
トビオース部分を特異的に加水分解しオリゴ糖を遊  
離する活性を持つエンド-β-N-アセチルグル  
コサミニダーゼ。

(2) アスバラギン残基に結合する糖鎖が高マン  
ノース型、混合型のみならず、複合型にも作用する  
特許請求の範囲(1)記載のエンド-β-N-アセ  
チルグルコサミニダーゼ。

(3) アスバラギン残基に結合する糖鎖がシアル酸  
を含む複合型である特許請求の範囲(2)記載のエ  
ンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ。

(4) アスバラギン残基に結合する糖鎖が、ペプチ  
ド、アミノ酸および天然の高分子タンパク質に結  
合した形である特許請求の範囲(1)記載のエンド

-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ。

(5) 酵素が作用する最適pHがpH 6.0~7.0で  
ある特許請求の範囲(1)記載のエンド-β-N-  
アセチルグルコサミニダーゼ。

(6) 4℃、4日間の保持条件において、酵素の安  
定pH範囲がpH 7.0~8.0である特許請求の範  
囲(1)記載のエンド-β-N-アセチルグルコサ  
ミニダーゼ。

(7) pH 7.0、10分間の保持条件において、酵  
素の安定温度範囲が40℃までである特許請求の  
範囲(1)記載のエンド-β-N-アセチルグルコ  
サミニダーゼ。

(8) ゲル浸透法で測定した酵素の分子量が95,000  
~105,000である特許請求の範囲(1)記載のエ  
ンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ。

(9) ムコール(Mucor)属に属し、エンド-β-  
N-アセチルグルコサミニダーゼを生産する能  
力を有する微生物を該微生物が生育しうる培地に  
培養し、培養物より目的物を採取することを特徴  
とするエンド-β-N-アセチルグルコサミニダ

ーゼ 製造方法。

(10) 微生物がムコール・ヒエマリス (*Mucor hiemalis*) である特許請求の範囲(9) 記載製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(以下、endo-β-GlcNAc-aseと略する。)およびその微生物による製造法に関するものである。さらに詳しくは、糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖の高マンノース型や混合型のみならず、複合型糖鎖に対しても作用する広い基質特性性を有する、endo-β-GlcNAc-aseおよびその微生物による製造法に関するものである。

糖タンパク質は動物の排泄物や植物の組織、微生物の細胞膜・細胞壁などに広く分布している。近年、糖タンパク質の糖鎖が、細胞の分化や細胞間認識など、生体内の分子識別現象に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。こ

本酵素は、糖タンパク質の糖鎖部分をタンパク部分より遊離することができるために、糖タンパク質糖鎖の構造および機能の解析に、非常に重要な酵素である。

(従来の技術) (発明が解決しようとする問題点)

従来、endo-β-GlcNAc-aseは、肺炎双球菌(*Diplococcus pneumoniae*)の生産するEndo-B、*Clotridium perfringens*の生産するEndo-CIおよびCII、*Streptomyces filicatus*の生産するEndo-Bなどが知られており、糖タンパクの糖鎖の研究に用いられているが、これらの酵素はいずれも特定の糖鎖に対してのみ作用する。

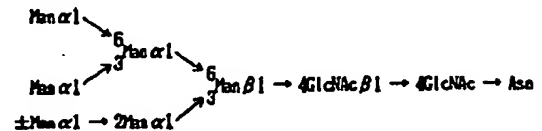
即ち、アスパラギン結合型糖鎖の構成としては、以下に示すような高マンノース型、混合型、複合型に分けられる。

これらの役割の解明には、その糖鎖の構造と機能の発明が重要な課題となっている。このような糖鎖の構造や機能を明らかにするための手段として、微生物の生産するさまざまな特異性の高いグリコシダーゼが注目されるようになり、この酵素法を用いた研究が広く行われている。しかしながら、糖タンパク質の糖鎖は、通常、複雑な構造を有しているため、エキソ型のグリコシダーゼのみによる分析はきわめて困難である。そこで、糖タンパク質から糖鎖部分をオリゴ糖として切り離す、エンド型のグリコシダーゼが非常に重要な酵素になると考えられてきた。

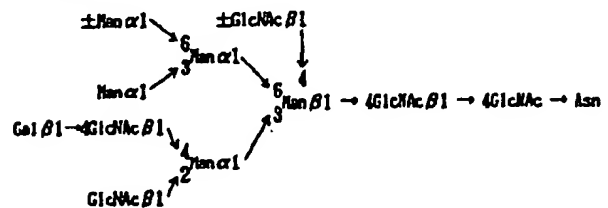
Endo-β-GlcNAc-aseは、糖タンパク質に存在するアスパラギン結合型の糖鎖に作用して、以下の様に糖鎖とタンパクとの結合部に存在するN、N'-ジアセチルキトビオース部分を切断し、糖鎖を遊離する。



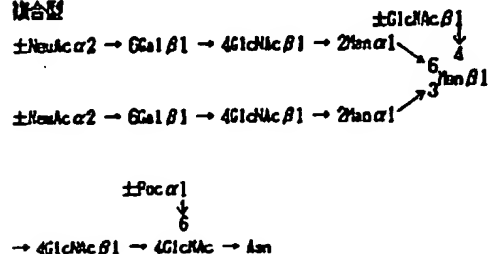
高マンノース型



混合型



複合型



上記の従来知られている  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase は、高マンノース型と混合型の糖鎖には作用するが、シアル酸 結合したままの複合型糖鎖には作用しない。最近見出された *Flavobacterium oenologosepticum* の  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase (Eado-P) は高マンノース型と複合型の糖鎖に作用するが、複合型糖鎖には高濃度の 2-メルカプトエタノールとノニデット (nonidet)-P40 などのタンパク質の変性剤の存在下でなければ作用しない。

(問題点を解決するこの手段)

しかし、本発明者らが土壌より単離した糸状菌である *ムコール属* の一面状が培養液中に生産する  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase は、高マンノース型や混合型の糖鎖のみならず、シアル酸が結合した複合型糖鎖にも作用し、しかも活性の発現に 2-メルカプトエタノールや界面活性剤のようなタンパク質変性剤を必要としない、新規な  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase であると認められるものである。

本発明者らは、糖タンパク質のアスバラギン結

合型糖鎖の高マンノース型や混合型のみならず、シアル酸の結合した複合型の糖鎖にも作用するという広い基質特異性を有するとともに、天然に存在する糖タンパク質を変性することなく、その糖鎖に直接作用しうる  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase を生産する菌を探索した結果、土壌より分離された糸状菌の培養液中に特異的な本酵素活性を見出した。このような微生物の培養液より単一タンパクとして  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は高マンノース型、混合型、複合型のいずれのアスバラギン結合型糖鎖にも作用し、かつ天然の糖タンパク質糖鎖に intact の状態のままに作用する特徴を有する新規な  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase を提供するものである。さらに、本発明は、*ムコール属* に属し前記の  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase を生産能を有する微生物を培養して、培養液より  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase を採取することを特徴とする  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase の製造方法をも提供するものである。

## BEST AVAILABLE COPY

本発明酵素は、糖タンパク質に存在する複合型を含めたほとんどのアスバラギン結合型糖鎖を遊離することができると共に、タンパク質変性剤などを添加してタンパク質を変性処理する必要がなく、糖タンパク質から糖鎖を遊離することができる極めて優れた性質を有している。それ故に、糖タンパク質の糖鎖およびタンパクの機能的、生理的役割を研究する上で、本発明酵素をその糖タンパク質に作用させることにより明らかにすることができる。即ち、本発明酵素を糖タンパクに作用させることにより、複合型を含めたほとんど全てのアスバラギン結合型糖鎖が除去されたタンパク質を得ることができ、その活性を調べる事が可能である。また、最近、菌細胞のアスバラギン結合型糖鎖の構造が、通常の菌細胞のそれと異なる構造に変化するという報告が多く発表され、糖タンパクの糖鎖の構造が注目されている。このような状況の中で糖鎖をタンパク質部分から遊離することが出来る本発明酵素は、切鎖の構造解析にも有用な酵素として利用されることが期待される。ま

た、本発明酵素は、通常の安価な培地で菌体を培養することにより、菌体外に分泌されるので、容易にかつ多量の酵素タンパクを得ることができ、研究用試薬として大量かつ安価な供給が可能である。

以下に本発明を更に詳細に説明する。後に示す実施例の方法で得られた  $\alpha$ -endo- $\beta$ -GlcNAc-ase の酵素化学的および理化学的性質は、下記のとおりである。

### 1. 作用

本発明酵素は、糖タンパク質のアスバラギン結合型糖鎖のタンパクとの結合近傍にある N, N'-ジアセチルアミノ糖部分を加水分解する作用を有する。

オリゴ糖……  $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn}$  - タンパク質

↓

オリゴ糖……  $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} + \text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn}$  - タンパク質

### 2. 基質特異性

本発明酵素は、卵白アルブミンから調製した培培ブチドに含まれている異なった種類の全ての糖

類、すなわち、高マンノース型、混合型のいずれのタイプの糖鎖をも分解する。また、ヒト血清中のトランスフェリンや子牛血清中のフェウリンから調製した糖ペプチドに含まれる複合型の糖鎖も分解する。複合型糖鎖については、シアル酸が結合したものであっても加水分解することができる。さらに本発明酵素は、トランスフェリンそのものを基質とした場合でも、糖鎖を遊離することが認められることから、天然の糖タンパク質に対しても作用し得るし、シアル酸の有無に関わらず作用することができる。

### 3. 力価の測定方法

本酵素の活性の測定は、ヒト血清トランスフェリンを硫酸プロナーゼ処理後、シアリダーゼによってシアル酸を除去して得られる糖ペプチド（アシアロ糖ペプチド）のダンシル化合物を基質として行った。pH 6.0 のリン酸カリウム緩衝液中、37℃で反応を行い、40%トリクロル酢酸を加えて反応を停止させた後、分解生成物をn-ブタノール-アセトン-水（3:1:1）を展開剤と

するペーパークロマトグラフィによって分離し、水で抽出した後、蛍光法にて定量する方法により行った。37℃における反応で、1分間に1  $\mu$ mol 基質を分解する酵素量を1単位（Unit: 本明細書において「U」と略称する）とする。

### 4. 至適pHおよび安定pH

至適pHは、第1図に示すとおりpH 6.0～7.0であり、安定pHは4℃で4日間処理した場合、pH 2.0～8.0であった。

### 5. 温度安定性

pH 7.0において各温度で10分間保持した後、残存する酵素活性を測定した。その結果、第2図に示したように40℃まで安定であった。

### 6. 阻害、活性化および安定化

本発明酵素に対する、種々の添加物質の影響について検討した結果、著しく活性化する添加物質は存在しなかった。金属塩の中では、HgCl<sub>2</sub>により阻害が認められたが、その他のものについては著しい影響は見られなかった。

本発明酵素の安定化剤はまだ見出されていない。

### 7. 精製方法

本発明酵素の精製は、塩析法、各種のクロマトグラフ法などを適宜に組合わせて行うことができる。精製の具体例は実施例に示すとおりである。

### 8. 分子重

本発明酵素の分子量は、セファデックスG-150によるゲルろ過法により約95,000～105,000と算出された。

次に、本発明酵素を微生物の培養によって製造する方法を具体的に示す。

本発明酵素の製造に使用される微生物は、ムコール(Mucor)属に属し、本発明酵素を生産する能力を有する微生物であればいかなるものでもよい。このような微生物の具体例としては、本発明者らにより土壌より分離されたMucor blaesii SK-314が挙げられる。この菌株の菌学的性質を以下に記載する。

#### A. 顕微鏡的観察

菌糸は隔壁がなく、胞子のう柄は気菌糸から長く伸長する。まれに分岐が見られた。先端に黒色

の丸い胞子のうが形成する。胞子は、だ円形である。栄養菌糸はよく発達している。

#### B. 肉眼的観察

各種培地における、生育の肉眼的観察の結果は次のとおりである。生育状態の観察は、28℃、2～3日間培養した場合の結果である。

##### (1) 普通寒天培地（肉エキスを寒天培地）

生育は良好で、白色の菌糸が立毛しビロード状でコロニーの周辺はなめらかである。基菌糸は淡黄色で、菌糸の平均生育速度は0.7～0.8 cm/日。

##### (2) 麦芽寒天培地

生育は良好で、菌糸が立毛しビロード状となる。基菌糸は淡褐色で、菌糸の平均生育速度は1.1～1.3 cm/日。

##### (3) MY20寒天培地

生育は良好で、黄褐色の綿毛状の菌糸が中央から広がり、周辺は白色で裏面になめらかに伸長する。基菌糸は淡黄褐色で、菌糸の平均生育速度は1.1～1.2 cm/日。培地中への淡黄褐色の色素の生育が認められる。

## (4) ムコール合成培地

生育は中程度で、淡黄色を帯びた白色の綿毛状の菌糸が伸長し、周辺は無色の菌糸が伸展している。基菌糸は極めて鮮明な黄色で、菌糸の平均生育速度は0.7~0.8 cm/日。

## (5) PDA培地(ポテト・グルコース培地)

生育は中程度で、淡黄色を帯びた白色の綿毛状の菌糸が伸長し、周辺は無色の菌糸が伸展している。基菌糸は淡黄色で、菌糸の平均生育速度は0.8 cm/日。

## (6) PCA培地(ポテト・人参培地)

生育は良くない。透明感のある綿毛状および白色の菌毛状菌糸が伸長する。白色の気菌糸は上方に伸長し、先端に黒色胞子のうを多数形成する。基菌糸はやや淡黄色で、菌糸の平均生育速度は0.5~0.6 cm/日。

## (7) Caspex 寒天培地

生育は極めて悪く、寒天上に薄く広がって灰白色を呈する。低温の方が良く生育する。菌糸の平均生育速度はおそく0.1~0.2 cm/日。

類が用いられ、場合によってはビタミン類などを、菌の生育を促進する目的で添加してもよい。

培養は、培地を通常の方法で凝固し、本発明の菌株を接種し、20~30℃、pH 6.5~7.0で2~3日間培養し、または、通気攪拌により、好気的に行う。

## (実施例)

本発明酵素は、以下の実施例により採取することができる。以下の実施例は、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

## 実施例1

グルコース 0.5%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.5%を含む培地500mlを、容量2lの瓶とラフラスコに分注し、120℃、15分間加圧滅菌した後、同じ組成の培地で前培養したムコール・ヒエマリスSK-314の菌株を5ml接種し、28℃、4日間培養し培地を培養した。培養終了後、濾過により菌体を除去、得られた培養液に10mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で緩衝化したCM-セルロースを1l当たり25g加えて、4

## C. 生理的性質

生育pH範囲は、pH 4.0~9.0であり、pH 6.0~7.0が最適である。生育温度範囲は10℃~30℃であり、34℃では生育しない。20℃~25℃が最適である。

以上の諸性質よりこの菌株をムコール・ヒエマリス(*Mucor hiemalis*)と同定し、微生物工業技術研究所に菌工研菌第10020号で寄託されている。

前記使用微生物の培養に用いる培地組成は、通常の微生物の培養に用いられるようなものであればどのようなものでもよい。炭素源としては、例えば、グルコース、フコース、アラビノース、シュクロース、可溶性デンプン、蜂蜜、デキストリンなどの糖質、窒素源としてはペプトン、肉エキス、酵母エキス、カザミノ酸、コーンステープリカー、各種アミノ酸、各種核酸、尿素などが挙げられる。無機塩としては、各種のナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、マグネシウム塩、リン酸塩、硫酸塩などの塩

にて2時間攪拌した。樹脂を濾過により除いた後、その濾液に炭素を70%飽和になるように添加して、4℃で2~3日間放置し、生成した沈殿を10mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解し、同緩衝液で一液透析した。この透析内液を同緩衝液であらかじめ平衡化したDCEAセーファローズCL-6Bカラム(3.4×60cm)に通し、吸着した酵素を0.3MNaClを含む同緩衝液を用いて溶出した。溶出された活性成分を集め炭素を80%飽和になるように加え、4℃にて2日間放置した。生成した沈殿を、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解し、同緩衝液で一液透析した後、この透析内液を同緩衝液で平衡化したハイドロキシルパタイトカラム(3.0×7.0cm)に通し、吸着した酵素を100mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で溶出した。溶出された活性成分を集めて炭素を80%飽和になるように添加し、生成した沈殿を10mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解した。この溶液を、あらかじめ同緩衝液で平衡化したセファデックスG-200カラム

(1.6×114cm)を用いてゲルイ過を行った。活性成分を集めて限外イ過器で濃縮後、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)であらかじめ平衡化したコンカナバリンA-セファロース4Bのカラム(1.0×4.5cm)に通し、同緩衝液で洗浄した後、10%のメチル- $\alpha$ -マンノシドを含む同緩衝液で酵素を溶出した。活性成分を集めて限外イ過により濃縮し、精製酵素製品を得た。

#### (発明の効果)

従来知られているendo- $\beta$ -GlcNAc-aseは、アスパラギン結合型糖鎖の高マンノース型と混合型には作用するが複合型糖鎖には作用しないもの、(例えば、特開昭61-265088)高マンノース型と複合型糖鎖に作用するが、複合型糖鎖には変性剤の存在下でなければ作用しないもの等であった。

本発明のendo- $\beta$ -GlcNAc-aseは、高マンノース型や混合型の糖鎖のみならず、複合型糖鎖にも作用し、しかも活性の発現に、2-メルカプトエタノールや界面活性剤のようなタンパク質

変性剤を必要としない、新規な酵素である。

この新規endo- $\beta$ -GlcNAc-aseは、本発明者らによって土壌より分離されたムコール菌の一菌株Noccel blenalisから容易に採取することができ、かかる方法によって得られた本発明の酵素は、癌細胞変位の糖鎖の構造解析を含め、生体内の分子識別現象解明のための有力な手段として、利用されることが大いに期待される。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明酵素の作用pH範囲を示す

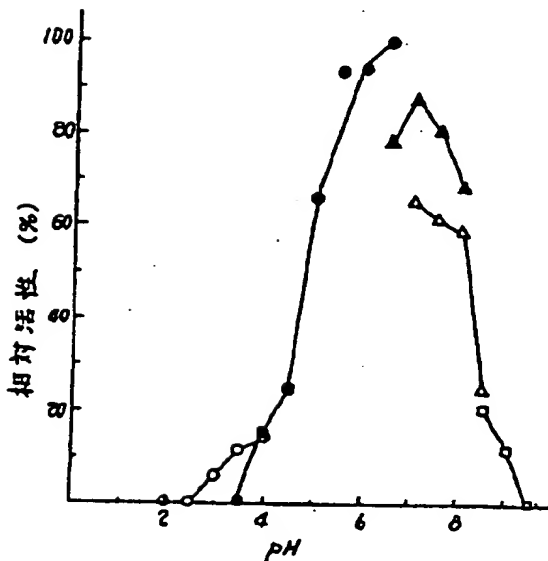
○—○はクエン酸-塩酸、●—●は酢酸、▲—▲はリン酸カリウム、△—△はトリス-塩酸、□—□はホウ酸の各緩衝液を示す。

第2図は本発明酵素の安定温度範囲を示す。

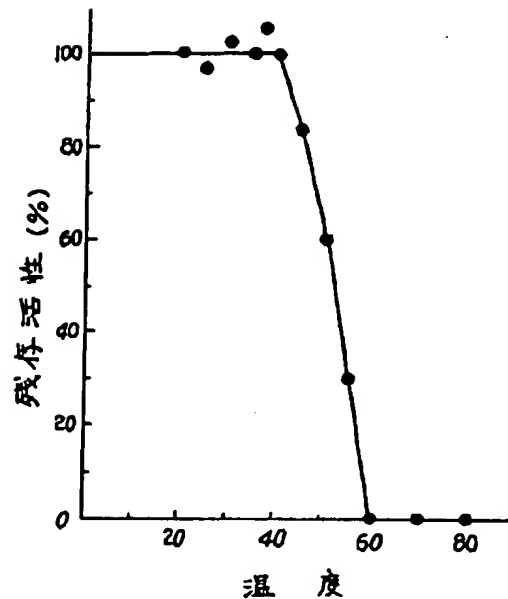
出願人 製鉄化学工業株式会社

代表者 増田 裕治

第1図



第2図



BEST AVAILABLE COPY

手続補正書 (自発)

昭和63年9月21日

特許庁長官 吉田 文毅 殿

道

5. 補正の内容

明細書第7頁第11行「(問題を解決するこ  
めの手段)」を「(問題を解決するための手段)  
」と訂正する。

以上

1. 事件の表示

昭和63年特許願第140055号

2. 発明の名称

エンドーβ-N-アセチルグルコ

サミニダーゼおよびその製造法

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

〒615-01

住所 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

名称 製鉄化学工業株式会社

代表者 増田 裕 浩

(TEL0794-17-2151)

4. 補正の対象

明細書



BEST AVAILABLE COPY